

MINISTERIE VAN LANDBOUW

BESTUUR VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK

RIJKSCENTRUM VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK
GENT

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE

Directeur : P. HOVART

De bepaling van de door vethydrolyse ontstane vrije vetzuren in visserijprodukten

W. VYNCKE



Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent)
Publikatie nr 28/1970

1. INLEIDING.

Tijdens de opslag van vis zijn de lipiden onderhevig aan diverse afbraakprocessen die de kwaliteit ongunstig beïnvloeden. Eén van deze processen is de hydrolyse, waarbij een reeks water-oplosbare verbindingen (glycerol, glycerofosfaat, choline, fosforylcholine enz.) en een reeks water-onoplosbare verbindingen (mono- en diglyceriden, lysofosfatiden, fosfatidinezuren, glycerylethers, alifatische alkoholen en vrije vetzuren) worden gevormd (1).

De vrije vetzuren zijn hierbij de meest typische afbraakprodukten. Zij zijn vooral van betekenis in diepvriesvis en zijn hoofdzakelijk uit de afbraak van fosfolipiden afkomstig (2) (3). In sommige gevallen echter kunnen zij ook uit triglyceriden ontstaan (4) (5).

De hydrolyse kan door biochemische processen, nl. door endogene of bacteriële enzymen (lipasen) doorgaan of ook nog van zuiver chemische aard zijn. Er valt hierbij op te merken, dat de hydrolyse van de vetten van de hoeveelheid aanwezig water afhankelijk is. Hoe lager de bewaartemperatuur van diepvriesvis is, des te minder water er in vloeibare toestand overblijft en des te trager de hydrolyse zal doorgaan. Daarenboven zal bij een lagere temperatuur de lipasen-aktiviteit geringer zijn.

Het bepalen van de totale hoeveelheid vrije vetzuren kan voor de hydrolytische vetafbraak van diepvriesvis een goede maatstaf vormen.

In deze publikatie werd dan ook de bepalmingsmethode op punt gesteld en op een reeks visserijprodukten uitgetest (*). Het nut van de methode voor de objektieve kwaliteitsbepaling van

(*) Wij bedanken de heer P. DE ROO, stagiair van het Hoger Technisch Instituut te Oostende voor de medewerking aan de proeven.

diepvriesvis zal echter tijdens verdere proeven dienen te worden onderzocht.

2. BEPALINGSMETODEN VOOR VRIJE VETZUREN.

Voor het bepalen van de vrije vetzuren wordt beroep gedaan ofwel op titrimetrische, ofwel op kolorimetrische methoden.

2.1. Titrimetrische methoden.

De titrimetrische methoden komen neer op een zuur-base titratie van de geëxtraheerde vetfractie. De diverse varianten hebben vooral betrekking op twee factoren, namelijk de extractiemethode, die alle lipiden moet extraheren, en het al dan niet verwijderen van fosfolipiden, waarvan verschillende een zuur karakter hebben en aldus de bepaling kunnen beïnvloeden.

De voornaamste werkwijzen zijn :

- (a) Titratie met 0,1 N ethanolische KOH en fenolftaleïne als indicator, na precipitatie van de fosfolipiden met aceton bij 0° C (2).
- (b) Titratie van alle lipiden (extractie met chloroform-methanol) naar fenolftaleïne in ethanol-benzeen-chloroform (1:1:1), (6) (7).
- (c) Titratie, na extractie, in ethanol ; vooraf worden de fosfolipiden met een kiezelzuurkolom verwijderd (8).
- (d) Scheiding van de vrije vetzuren van de rest van de lipidenfractie door Amberlite IRA-400^R (OH⁻-vorm).

De vrije vetzuren, die worden weerhouden, worden met HCl-wa-ter-ether-methanol geëluëerd (4:6:170:40) (9).

- (e) Scheiding van de vrije vetzuren door wassen van een etheroplossing van de lipiden met verdunde natriumcarbonaat (2).
- (f) Scheiding door de in petroleumether (kpt. 40-60°) opgeloste lipiden op een kolom van silicagel te brengen ; daarna elueren van alle niet-fosforbevattende lipiden met ethylether (3) (10).
- (g) Scheiding door chromatografie op kiezelzuur en elutie van de niet-fosforbevattende lipiden met lichte petroleumether (kpt. 60-80°) - (95:5) als elueermiddel (2).
- (h) Titratie met 0,01 N NaOH van de lipiden in 3 ml ethanol opgelost t. o. v. thymolblauw ; het eindpunt wordt kolorimetrisch bepaald (11).

Bij drie methoden (a), (b) en (g) wordt aldus rechtstreeks op het extrakt gewerkt.

Bij de overige methoden worden de lipiden eerst door vakuumverdamming geïsoleerd. Daarna worden zij in het gewenste solvent opgelost voor verwijdering van de fosfolipiden.

2.2. Kolorimetrische methoden.

De kolorimetrische methoden steunen op de extinktie bij een bepaalde golflengte van complexen van de vrije vetzuren met koper.

De varianten hebben vooral betrekking op drie factoren, namelijk het solvent waarin wordt gewerkt, de wijze van

bepaling van het kopercomplex en het al dan niet verwijderen van de fosfolipiden.

De voornaamste werkwijzen zijn :

- (a) Meten van de extinktie bij 640 nm van een monster opgelost in benzeen na toevoegen van 5 % waterig koper II acetaat-oplossing (12) (13).
- (b) Meten van de extinktie bij 500 nm.
Difenylcarbazine wordt gebruikt voor de bepaling van Cu dat met de vrije vetzuren gebonden is ; als solvent wordt chloroform-heptaan-methanol genomen.
Fosfolipiden worden eerst met kiezelzuur verwijderd (14)
- (c) Meten van de extinktie bij 440 nm.
Men laat de vrije vetzuren in chloroformmidden reageren met kopernitraat ; het Cu wordt met diethyldithiocarbamaat gedoseerd.
Fosfolipiden worden eerst met ijsgekoelde aceton en magnesiumchloride verwijderd (15) (16) (17).
- (d) Diethyldithiocarbamaat wordt gebruikt voor het doseren van Cu in een complex van vrije vetzuren gevormd door toevoegen van kopersulfaat-ammoniak ; er wordt in chloroform gewerkt (18).

De methode (a) werd voorgesteld voor het bepalen van de vrije vetzuren in plantaardige oliën. De eigen kleur van de olie blijkt in sommige gevallen storend te werken. De overige methoden werden uitgewerkt voor het bepalen van de vrije vetzuren in bloed, plasma en serum, meestal op zeer kleine frakties.

Duncombe (17) stelt hierbij voorop dat chloroform het enig geschikt oplosmiddel is. Triglyceriden, cholesterol en cholesterolesters werken niet storend. Fosfolipiden moeten evenwel worden verwijderd.

3. TITRIMETRISCHE BEPALING VAN DE VRIJE VETZUREN.

Na het bestuderen van de verschillende methoden die in de literatuur voorkomen (hoofdstuk II), bleek de titratiemethode met ethanolische KOH de meeste mogelijkheden te bieden. De meeste auteurs (2) (3) (8) (9) (10) (14) (15) (16) (17) raden aan de fosfolipiden te verwijderen, daar bepaalde van deze lipiden een zuur karakter hebben. Anderen passen evenwel de rechtstreekse titratie toe (19) (20). De invloed van de voorafgaandelijke verwijdering van de fosfolipiden werd dan ook onderzocht.

De adsorptiemethode op een kiezelzuurkolom werd hiervoor gevolgd (2) (8) (14) (21).

3.1. Bereiden van visextrakten.

Voor het extraheren van de vetfractie werd de methode van Bligh en Dyer (22) gebruikt.

Een hoeveelheid gemalen visweefsel, bevattende $80, \pm 1$ g water, wordt met 200 ml methanol en 100 ml chloroform gedurende twee minuten in een mixer gehomogeniseerd. Er wordt een homogeen mengsel bekomen.

Door mengen met achtereenvolgens 100 ml chloroform en 100 ml water, telkens gedurende dertig seconden, ontstaan twee fasen en de vaste bestanddelen worden afgefiltreerd. De chloroformlaag bevat de lipiden en vrije vetzuren.

3.2. Bereiden van de adsorptiekolom.

3.2.1. Apparatuur.

Adsorptiekolommen met een hoogte van 30 tot 100 mm en een diameter van 8 à 19 mm voorzien van een grof gesinterde bodem G. O.

Mikroburet van 1 ml, in 0,01 ml verdeeld.

3.2.2. Reagens.

Kiezelzuur : reagens geschikt voor chromatografie (U. C. B., 100 mesh).

Een selectie van de korrelgrootte werd doorgevoerd door opeenvolgende sedimentatie in methanol (2 maal) en in aceton, waarna wassen in ether (21).

Het kiezelzuur wordt bij 120° C gedurende 16 u ge-aktiveerd (8).

3.2.3. Bereiden van de kolom.

Er wordt een brij van kiezelzuur in diethylether gemaakt. Deze brij wordt in de kolom gebracht en men laat het kiezelzuur sedimenteren. Er wordt een witte grofkorrelige kolom verkregen. Daar de lipiden in chloroform zijn opgelost, moet de kolom eerst tegenover dit solvent worden gestabiliseerd.

Proefondervindelijk werd vastgesteld dat het best is de overvloedige ether te laten weglopen tot 2 mm boven de kolom. Vervolgens wordt evenveel chloroform ingebracht als het volume van de kolom zelf. Men schudt even goed, zodat de dichtheid van het oplosmiddel overal dezelfde is, en vervolgens laat men se-

dimenteren tot konstante hoogte. Eventuele luchtbelllen worden door zacht tikken verwijderd. Opnieuw wordt de vloeistof tot 2 mm boven de kolom door uitlopen verwijderd vooraleer te wassen met zuivere chloroform.

Het wassen wordt uitgevoerd tot een doorzichtige gelachtige kolom met een lichte blauwe schijn wordt verkregen. Proefondervindelijk werd vastgesteld dat dit gel na vijfmaal wassen, telkens met 5 ml chloroform wordt verkregen.

3.3. Uittesten van de adsorptiekolom.

3.3.1. Afmetingen.

Uit vergelijkende proeven is gebleken, dat de diameter geen invloed heeft. Kolommen met een diameter van 8, 12 en 19 mm werden hierop getest.

Verschillende kolomhoogten (10, 20, 30, 50, 80, en 100 mm) werden eveneens vergeleken. De hoogten lager dan 30 mm bleken minder te voldoen, dit dan door storingen te wijten aan het opbrengen van de oplossing.

Er wordt verder aangenomen dat een ladingsbezetting van ± 1 mg P per gram adsorbeermiddel of 1 grammolekule fosfolipide per 40 gram adsorbeermiddel nodig is (23).

Wanneer dit wordt toegepast voor lecithine, wordt bekomen :

MG lecithine : 658

MG fosfor : 31

lecithine bevat 1 atoomfosfor per molekule

Een kolom van 1 g kiezelzuur kan aldus maximaal 658/31 of 20 mg lecithine adsorberen.

3.3.2. Blanko's.

Vergelijkende proeven op chloroform, na elutie op kolom en rechtstreeks werden uitgevoerd. De resultaten zijn in tabel 1 weergegeven.

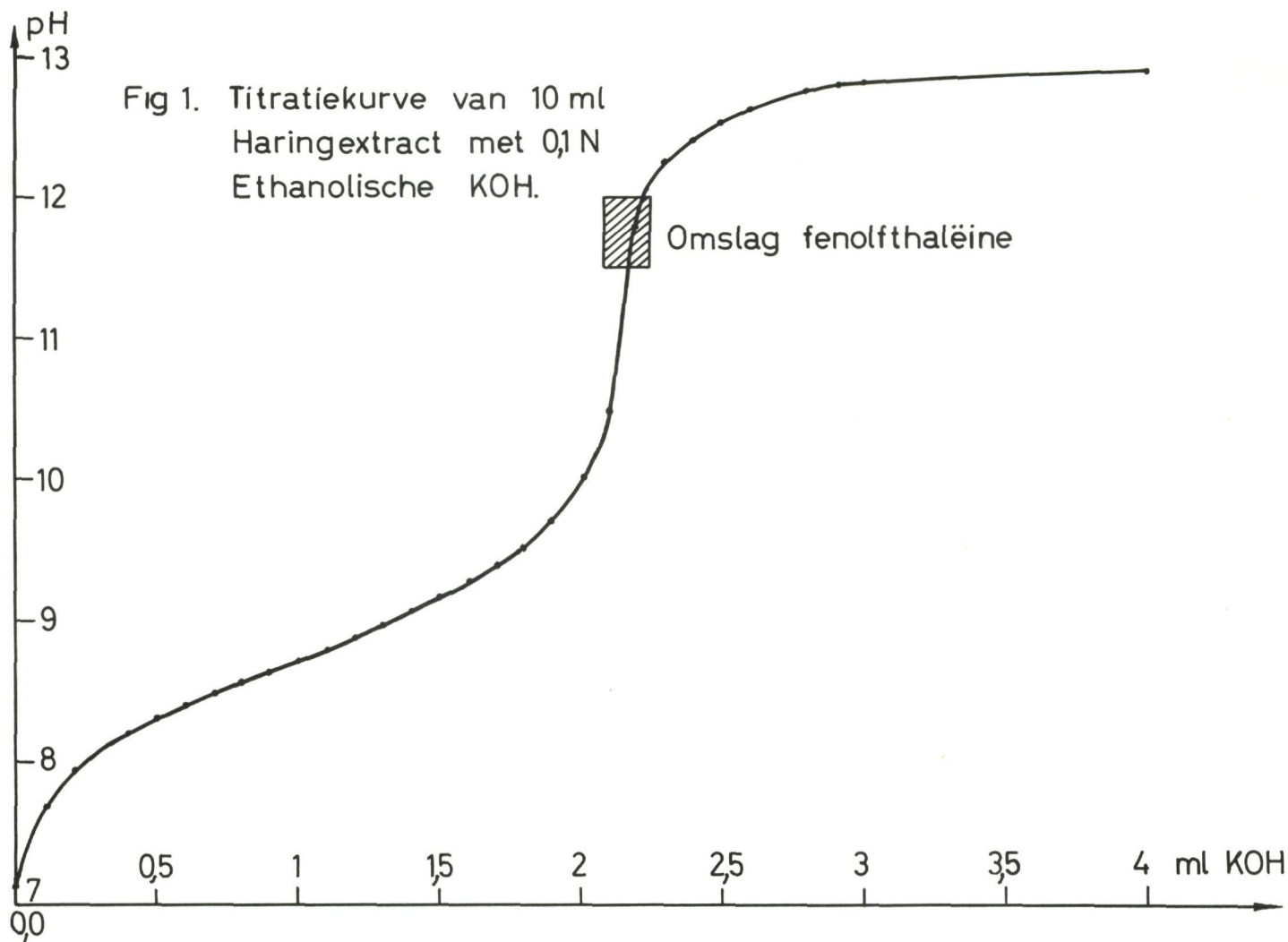
Tabel 1. - Uittesten van de blanko (titratie met ethanolische KOH 0,1 N tegenover fenolfthaleïne).

Gewicht kiezelzuur in g	10 ml CHCl ₃	10 ml CHCl ₃ na elutie	ml KOH 0,1 N
-	x	-	0,020
2	-	x	0,020
5	-	x	0,018
10	-	x	0,028

Deze proeven tonen aan dat de bereiding van de kolom de blanko's praktisch niet beïnvloedt.

3.3.3. Keuze van base en indikator.

De titratie die wordt uitgevoerd is een zuur-base titratie. De vrije vetzuren worden met een base van gekende titer in ethanol opgelost geneutraliseerd. De neutralisatiereactie grijpt immers plaats in nietwaterig midden. Deze beperking is een gevolg van de gevolgde extraktiemethode. Uit oriënterende proeven is hierbij gebleken dat bij gebruik van een base, opgelost in water, de titratie onnauwkeurig wordt, door de vorming



van een witte melkachtige troebel (emulsievorming), die het omslagpunt van de indikator zeer onduidelijk maakt.

Tijdens deze proeven werden de titraties dan ook met 0,1 N ethanolische KOH uitgevoerd.

De meeste auteurs gebruiken fenolftaleïne als indikator. Andere voorgestelde indicatoren zijn rosolzuur (24) en nijlblauw (25). De drie indicatoren (0,1 %) werden vergeleken op een haringextrakt (tabel 2). Ook thymolftaleïne werd beproefd. Met deze indikator werd evenwel geen scherp omslagpunt verkregen.

Tabel 2. - Testen van drie indicatoren (in ml 0,1 N KOH).

	Fenolftaleïne	Nijlblauw	Rosolrood
5 ml extrakt	0,652	0,644	0,577
5 ml extrakt + 20 ml CHCl_3	0,656	0,658	0,685
25 ml CHCl_3 (blanko)	0,015	0,146	0,113

Uit deze resultaten blijkt, dat nijlblauw en rosolrood een hoge blankowaarde geven en het omslagpunt door de hoeveelheid chloroform wordt beïnvloed. Dit omslagpunt is daarenboven minder duidelijk dan bij fenolftaleïne. Deze laatste indikator blijkt dan ook het meest geschikt voor de titratie van vrije vetzuren te zijn. Dat werd bevestigd door het opstellen van de titratiecurve (figuur 1) waarbij 10 ml haringextrakt werd gebruikt. De te titreren oplossing werd hierbij voortdurend op een magnetische roerder met verlichte plaat in beweging gehouden. De kleuomslag gebeurde bij pH 11,5 à 12, hetgeen bevredigend is.

Op te merken valt tenslotte dat voor gekleurde visextrakten (bv. rode zalm) het eindpunt van de titratie best potentiometrisch wordt bepaald.

3.3.4. Onderzoek met zuivere vetzuren.

Dit onderzoek werd uitgevoerd om na te gaan of vrije vetzuren niet door het kiezelzuur worden geadsorbeerd.

Twee vetzuren die goed in vis vertegenwoordigd zijn (4) werden gebruikt : een onverzadigd vetzuur, oliezuur ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$, heptadekeen-8-carbonzuur-1) en een verzadigd vetzuur, palmitinezuur ($\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$, pentadekaan-carbonzuur-1).

Het gedrag van de twee zuren ten opzichte van de kiezelzuurkolom werd getest door opbrengen van een monster van 5 ml zuuroplossing (1 % in chloroform), waarna met chloroform werd geëluëerd.

De resultaten zijn in tabellen 3 en 4 opgenomen.

Tabel 3. - Invloed van oliezuur op een kiezelzuurkolom.

Proef	Gewicht kiezelzuur in g	Blanko ml O, 1N KOH	ml CHCl_3 voor elutie	Eluens ml O, 1 N KOH
1	2	1, 54	15	1, 54
2	5	1, 54	25	1, 52
3(*)	5	1, 54	15	1, 54
4	5	1, 56	20	1, 54

(*) Proef 3 op dezelfde kolom als proef 2.

Tabel 4. - Invloed van palmitinezuur op een kiezelzuurkolom.

Proef	Gewicht kiezelzuur in g	Blanko ml 0,1 N KOH	ml CHCl_3 voor elutie	Eluens ml 0,1 N KOH
1	10	2,19	55	2,20
2(*)	10	2,19	35	2,18
3	5	2,19	20	2,18
4(*)	5	2,19	20	2,20

(*) Proeven 2 en 4 respectievelijk op kolommen 1 en 3 ge-
elueerd.

Adsorptie van verzadigde vetzuren blijkt aldus niet
op te treden.

Uit tabellen 3 en 4 volgt, dat de vetzuren op de
kolom niet worden geadsorbeerd, zelfs indien de proefomstandig-
heden (hoeveelheid elueermiddel, gewicht kiezelzuur, opnieuw ge-
bruiken van dezelfde kolom) worden gewijzigd.

3. 5. Onderzoek met lecithine.

Zoals vermeld, heeft de kiezelzuurkolom tot doel
bepaalde zure fosfolipiden te verwijderen. Dit werd op zuiver
lecithine getest.

Haring bevat ongeveer 750 mg fosfolipiden per
100 g vis (1). Ongeveer de helft van de fosfolipiden bestaat
uit lecithine, hetzij ongeveer 400 mg lecithine per 100 g vis.
Bij de extractie van de lipiden uit 100 g vis wordt een chloro-
formlaag van 200 ml bekomen, waarin aldus 20 mg lecithine
per 10 ml voorkomt.

De gevolgde werkwijze is analoog als voor de
vetzuren.

De gebruikte lecithine-oplossingen (lecithine uit eieren, purissimum, Merck) bevatten respectievelijk 25, 40 en 50 mg lecithine per 10 ml chloroform.

De resultaten worden in tabel 5 weergegeven.

Uit deze resultaten blijkt wel degelijk dat lecithine door de kolom wordt geadsorbeerd en de titratie anders zou beïnvloeden.

4. TESTEN VAN DE METODE OP VISSERIJPRODUKTEN.

4.1. Werkwijze.

Ten einde een beter inzicht in de noodzakelijkheid voor het al dan niet gebruiken van een kiezelzuurkolom vóór de titratie van de vrije vetzuren te verkrijgen, werd een reeks proeven op diepgevroren haring (*Clupea harengus* L), kabeljauw (*Gadus morhua* L), schol (*Pleuronectes platessa* L), rode zeebaars (*Sebastes marinus* L), hondstong (*Pleuronectes cynoglossus* L), en garnalen (*Crangon vulgaris* Fabr.) van uiteenlopende ouderdom uitgevoerd. Telkens werd de rechtstreekse titratie met deze na elutie op een kiezelzuurkolom vergeleken.

Als adsorbeermiddel werd 3 g kiezelzuur genomen in een kolom van 12 mm diameter ; de hoogte bedraagt dan ongeveer 8 cm.

Er werden 5 ml extract gebruikt en met 25 ml chloroform geëluëerd. Voor de rechtstreekse titratie werden eerst 25 ml chloroform toegevoegd, ten einde in dezelfde omstandigheden te werken. De proeven werden tienmaal (voor garnalen vijfmaal) op eenzelfde partij vis uitgevoerd. De vis

Tabel 5. - Invloed van lecithine op een kiezelzuurkolom.

Proef (*)	Gewicht kie- zelzuur per proef	Aantal ml lecithine oplossing opgebracht	mg lecithine per 100 ml CHCl ₃	Blanko ml 0,1 N KOH	ml CHCl ₃ voor elutie	Eluens ml 0,1 N KOH
1	2	5	500	0,120	20	0,030
2	2	10	500	0,240	15	0,070
3	5	5	500	0,120	30	0,024
4	5	10	500	0,240	25	0,030
5	2	10	500	0,240	5	0,052
6	2	10	500	0,236	15	0,040
7	1	5	400	0,060	20	0,012
8	1	10	400	0,120	5	0,010
9	2	5	250	0,060	25	0,008
10	2	5	250	0,060	50	0,060
11	1	5	400	0,060	10	0,008

(*) Eluties 2, 4, 6, 8, 10 werden uitgevoerd op dezelfde kolom als respectievelijk 1, 3, 5, 7, 9.

werd bij -28°C bewaard en tegen het uitdrogen van een ijslaag (glazuurlaag) voorzien. Er werd geen bijzondere verpakking aangewend.

4.2. Resultaten.

De resultaten werden in tabellen 6 tot 11 vermeld.

Tabel 6. - Titratie van haringextracten met en zonder kiezelzuurkolom (in ml KOH 0,1 N).

Ouderdom	Proef	Rechtstreeks	Met kolom	Vershil
2 m	1	0,161	0,119	- 0,042
	2	0,155	0,102	- 0,053
	3	0,180	0,140	- 0,040
	4	0,194	0,155	- 0,039
	5	0,159	0,123	- 0,036
	6	0,175	0,156	- 0,019
	7	0,140	0,112	- 0,028
	8	0,157	0,124	- 0,033
	9	0,161	0,099	- 0,062
	10	0,195	0,150	- 0,045
Gem.		0,168	0,128	- 0,040
24 m(*)	1	1,260	1,260	- 0,000
	2	1,268	1,260	- 0,008
	3	1,036	1,040	+ 0,004
	4	1,048	1,040	- 0,008
	5	1,068	1,070	+ 0,002
	6	1,066	1,054	- 0,012
	7	1,038	1,040	+ 0,002
	8	1,064	1,060	- 0,004
	9	1,040	1,062	+ 0,022
	10	1,070	1,064	- 0,006
Gem.		1,096	1,095	- 0,001

(*) Duidelijk ranzig.

Tabel 7 - Titratie van kabeljauwextrakten met en zonder kiezel-
zuurkolom (in ml KOH 0,1 N).

Ouderdom	Proef	Rechtstreeks	Met kolom	Vershil
6 m (a)	1	0,175	0,137	- 0,038
	2	0,178	0,160	- 0,018
	3	0,248	0,201	- 0,047
	4	0,197	0,180	- 0,017
	5	0,199	0,180	- 0,019
	6	0,185	0,148	- 0,037
	7	0,190	0,172	- 0,018
	8	0,175	0,140	- 0,035
	9	0,205	0,190	- 0,015
	10	0,193	0,173	- 0,020
Gem.		0,194	0,168	- 0,026
12 m (b)	1	0,300	0,330	+ 0,030
	2	0,298	0,330	+ 0,032
	3	0,302	0,328	+ 0,026
	4	0,246	0,240	- 0,006
	5	0,245	0,305	+ 0,060
	6	0,270	0,342	+ 0,072
	7	0,310	0,320	+ 0,010
	8	0,300	0,350	+ 0,060
	9	0,310	0,315	+ 0,005
	10	0,450	0,440	- 0,010
Gem.		0,303	0,350	+ 0,027

(a) Noordzeekabeljauw

(b) IJsland-kabeljauw

Tabel 8. - Titratie van scholextrakten met en zonder kiezelzuur-kolom (in ml KOH 0,1 N)

Ouderdom	Proef	Rechtstreeks	Met kolom	Vershil
2 m	1	0,150	0,128	- 0,022
	2	0,130	0,105	- 0,025
	3	0,153	0,119	- 0,034
	4	0,131	0,113	- 0,018
	5	0,112	0,080	- 0,032
	6	0,133	0,075	- 0,058
	7	0,136	0,062	- 0,074
	8	0,140	0,095	- 0,055
	9	0,146	0,120	- 0,026
	10	0,151	0,123	- 0,028
Gem.		0,139	0,102	- 0,037
12 m	1	0,222	0,192	- 0,030
	2	0,224	0,173	- 0,051
	3	0,188	0,130	- 0,058
	4	0,211	0,161	- 0,050
	5	0,205	0,668	- 0,037
	6	0,238	0,208	- 0,030
	7	0,243	0,221	- 0,022
	8	0,262	0,243	- 0,019
	9	0,232	0,180	- 0,052
	10	0,245	0,225	- 0,020
Gem.		0,227	0,190	- 0,037

Tabel 9. - Titratie van hondstongextracten met en zonder kolom kiezelzuur (in ml KOH 0,1 N).

Ouderdom	Proef	Rechtstreeks	Met kolom	Vershil
6 m	1	0,268	0,254	- 0,014
	2	0,258	0,229	- 0,029
	3	0,267	0,248	- 0,019
	4	0,252	0,219	- 0,033
	5	0,234	0,205	- 0,029
	6	0,222	0,201	- 0,021
	7	0,247	0,225	- 0,022
	8	0,259	0,232	- 0,027
	9	0,270	0,241	- 0,029
	10	0,229	0,206	- 0,023
Gem.		0,251	0,226	- 0,025

Tabel 10. - Titratie van rode zeebaarsextracten met en zonder kolom kiezelzuur (in ml KOH 0,1 N).

Ouderdom	Proef	Rechtstreeks	Met kolom	Vershil
3 m	1	0,122	0,110	- 0,012
	2	0,113	0,108	- 0,005
	3	0,138	0,119	- 0,019
	4	0,118	0,113	- 0,005
	5	0,127	0,115	- 0,012
	6	0,142	0,140	- 0,002
	7	0,155	0,150	- 0,005
	8	0,168	0,160	- 0,008
	9	0,135	0,134	- 0,001
	10	0,122	0,115	- 0,007
Gem.		0,122	0,114	- 0,008

Tabel 11 - Titratie van garnalenextrakten met en zonder kolom kiezelzuur (in ml KOH 0,1 N).

Ouderdom	Proef	Rechtstreeks	Met kolom	Vershil
1 m	1	0,351	0,077	- 0,274
	2	0,311	0,094	- 0,217
	3	0,355	0,084	- 0,271
	4	0,404	0,068	- 0,336
	5	0,375	0,077	- 0,298
Gem.		0,359	0,080	- 0,279

4.3. Diskussie.

De bekomen verschillen werden op hun significantie getest met behulp van de toets van de gepaarde vergelijkingen (26). Alle waarden met uitzondering van haring 24 m (tabel 6), bleken wezenlijk te verschillen.

Uit de resultaten van tabellen 6 tot 11 blijkt, dat in de meeste gevallen lagere titratiewaarden na elutie op een kiezelzuurkolom worden bekomen. Dit wijst er op dat wel degelijk zure componenten (fosfolipiden) dienen te worden verwijderd. Het verschil tussen de rechtstreekse en onrechtstreekse bepaling is echter én van de vissoort én van de duur van de opslag (hydrolysegraad) afhankelijk. Zo werd voor rode zeebaars bijvoorbeeld een veel kleiner, alhoewel nog significant, verschil genoteerd (tabel 10) dan bij de andere vissoorten.

Voor garnalen valt integendeel het zeer groot verschil op. Deze schaaldieren moeten dan ook een relatief grotere hoeveelheid zure fosfolipiden bevatten.

In twee gevallen echter werden andere resultaten bekomen. Bij de proef met haring van 24 m diepvriesopslag (tabel 6) waren de waarden van beide titraties praktisch gelijk. Op te merken valt echter dat de waarden veel hoger lagen dan bij de proef met haring van 2 maanden. Dit wijst op een hoge hydrolysegraad, zodat de zure fosfolipiden waarschijnlijk reeds afgebroken waren en de titratie niet meer konden beïnvloeden.

Bij de proef met IJslandse kabeljauw van 12 maanden (tabel 7) bleken na doorgang door de kiezelzuurkolom hogere waarden bekomen te worden, hetgeen erop wijst dat ook basische verbindingen op de kolom worden gebonden.

Uit aanvullende proeven is gebleken dat dit inderdaad het geval is. Een chloroformoplossing die 55 mg ammoniak per 5 ml bevatte (bekomen door absorptie in een gaswasfles), na elutie geen ammoniak meer. Anderzijds werd bepaald hoeveel totale vluchtige basische stikstof (TVB) in het visextrakt aanwezig was (27). In het vlees van de kabeljauw was deze waarde relatief hoog, nl. gemiddeld 35 mg N % t. o. v. 20-25 mg N % voor versere vis. Hiervan bleek ca 0,1 mg N/ml in de chloroformlaag over te komen. Voor 5 ml extrakt komt dit met ongeveer 0,035 ml KOH 0,1 N overeen. Dit kan aldus de hogere waarde van de onrechtstreekse titratie verklaren. Ook bij rode zeebaars kan het kleine verschil tussen beide titraties waarschijnlijk gedeeltelijk aan de hogere TVB-waarde (gemiddeld 30 mg N %) worden toegeschreven.

In ieder geval tonen deze proeven aan, dat voor de bepaling van de vrije vetzuren een kiezelzuurkolom dient te worden aangewend. Deze kolom houdt zowel storende zure als basische componenten tegen. Te noteren valt echter dat bij zeer verse vis deze laatste verbindingen te verwaarlozen zijn, hetgeen voor diepvriesvis meestal het geval is.

Verdere proeven zullen nog moeten uitwijzen of de bepaling van de vrije vetzuren voor de objektieve kwaliteitsbepaling van diepvriesvis waardevol is.

SAMENVATTING.

De titrimetrische bepaling van vrije vetzuren die met chloroform-methanol werden geëxtraheerd werd uitgetest. Hierbij werd de noodzakelijkheid onderzocht om vooraf de fosfolipiden, waarvan sommige een zuur karakter hebben, met een kizelzuurkolom te verwijderen. Vergelijkende proeven op diepgevroren kabeljauw, haring, schol, rode zeebaars, hondstong en garnalen van uiteenlopen de ouderdom uitgevoerd, gaven een bevestigend antwoord. Daarenboven bleken ook basische verbindingen te worden geadsorbeerd.

De hoogte van de kolom heeft praktisch geen invloed en fenolftaleïne blijkt de beste indikator voor de titratie te zijn.

LITERATUUR.

- (1) Lovern, J. (1962) : Fish in Nutrition, E. Heen en R. Kreuzer Ed., (FAO Rome), Fishing News (Books) London, p. 86.
- (2) Lovern, J., Olley, J. en Watson, H. (1959) : J. Sci. Food Agric. 10, 327.
- (3) Garcia, M., Lovern, J. en Olley, J. (1956) : Biochem. J. 62, 99.
- (4) Olley J., Pirie, R. en Watson, H. (1962) : J. Sci. Food Agric. 13, 501.
- (5) Soudan, F. (1965) : La conservation par le froid des poissons, mollusques et crustacés, J.B. Baillière & Fils, Paris.
- (6) Dyer, W. en Fraser, D. (1959) : J. Fish. Res. Bd. Can. 16, 43.
- (7) Dyer, W. en Morton, M. (1956) : J. Fish. Res. Bd. Can. 13, 129.
- (8) Olley, J. en Lovern, J. (1960) : J. Sci. Food Agr. 11, 644.
- (9) Hanahan, D., Dittmer, J. en Warashina, E. (1957) : J. Biol. Chem. 228, 685.

- (10) Lovern, J. (1956) : Biochem. J. 63, 373.
- (11) Chakrabarti, B. (1962) : Clin. Chim. Acta 7, 450.
- (12) Basilico, F. (1966) : Corr. Farm. 21, 534.
- (13) Baker, D. (1964) : J. Amer. Oil Chem. Soc. 41, 21.
- (14) Laurell, S. en Tibbling, G. (1967) : Clin. Chim. Acta 16, 57.
- (15) Austall, H. en Trujillo, J. (1965) : J. Clin. Chem. 11, 741.
- (16) Duncombe, W. (1962) : Biochem. J. 83, 6 P.
- (17) Duncombe, W. (1963) : Biochem. J. 88, 7.
- (18) Barreto, R. en Mano, D. (1961) : Clin. Chim. Acta 6, 887.
- (19) MacCallum, W., Adams, D., Ackman, R., Ke, P., Dyer, W., Fraser, D. en Punjamapirom (1969) : J. Fish. Res. Bd. Can. 26, 227.
- (20) De Silva, M. (1962) : J. Sci. Food Agric. 13, 160.
- (21) McCarthy, A. en Duthie, A. (1962) : J. Lipid Res. 3, 117.
- (22) Bligh, E. en Dyer, W. (1959) : Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911.
- (23) Smith, I. (1963) : Chromatographic and Electrophoretic Techniques, Vol. I, 2e Uitg., Interscience Publ. New York, p. 369.
- (24) Dyer, W., Morton, M., Fraser, D. en Bligh, E. (1956) : J. Fish. Res. Bd. Can. 13, 569.
- (25) Carlson, L. en Pernow, B. (1961) : J. Lab. Clin. Med. 58, 673.
- (26) Bauer, E. (1960) : A Statistical Manual for Chemists, Academic Press, New York.
- (27) Vyncke, W. (1964) : De Objektieve Kwaliteitsbepaling van Vis, Ministerie van Landbouw, Rijksstation voor Zeevisserij, Oostende, Publikatie 5.

